

New fusion protein

Patent Number: DE19735105
Publication date: 1999-03-04
Inventor(s): AKTORIES KLAUS PROF DR DR (DE); BARTH HOLGER DR (DE); HOFMANN FRED DR (DE)
Applicant(s): ALBERT LUDWIGS UNI FREIBURG (DE)
Requested Patent: DE19735105
Application Number: DE19971035105 19970813
Priority Number (s): DE19971035105 19970813
IPC Classification: C07K14/33; C07K14/245; A61K31/70; A61K48/00; C07H21/04; C07K19/00; C12N15/62; C12N15/11; C12N15/63; A61K38/00
EC Classification: C07K14/32, C07K14/33
Equivalents:

Abstract

A Fusion protein (I) comprises: (a) an interaction domain which can bind to a binding domain; and (b) a peptide chain which has to be transported into a target cell. Independent claims are also included for: (1) a polypeptide comprising a binding domain, which can specifically bind to the interaction domain of (I); (2) a protein transport system comprising (I); (3) a nucleic acid construct encoding (I) and the polypeptide; and (4) a medicinal agent comprising (I) and the polypeptide.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenl gungsschrift
⑯ DE 197 35 105 A 1

⑯ Aktenzeichen: 197 35 105.0
⑯ Anmeldetag: 13. 8. 97
⑯ Offenlegungstag: 4. 3. 99

⑯ Int. Cl. 6:
C 07 K 14/33

C 07 K 14/245
A 61 K 31/70
A 61 K 48/00
C 07 H 21/04
C 07 K 19/00
C 12 N 15/62
C 12 N 15/11
C 12 N 15/63
A 61 K 38/00

⑯ Anmelder:	WO 96 38 571 A2 WO 96 29 417 A1 WO 95 22 618 A1
⑯ Vertreter:	Chemical Abstracts: Ref. 246798, Vol. 127, 1997; Ref. 171221, Vol. 127, 1997; Ref. 132533d, Vol. 127, 1997; Ref. 14278d, Vol. 126, 1997; Ref. 308657z, Vol. 124, 1996; Ref. 278463t, Vol. 123, 1995; Ref. 235631s, Vol. 120, 1994; Ref. 235530h, Vol. 120, 1994; Ref. 291810m, Vol. 120, 1994; Ref. 189726, Vol. 120, 1994; Ref. 162459, Vol. 118, 1993; Ref. 51967h, Vol. 118, 1993; Ref. 21259r, Vol. 117, 1992; Ref. 273038h, Vol. 115, 1991; Ref. 84908f, Vol. 115, 1991; Ref. 110481s, Vol. 113, 1990; Ref. 57347z, Vol. 113, 1990; Ref. 109394x, Vol. 110, 1989; Ref. 219576h, Vol. 106, 1987; Ref. 103262g, Vol. 104, 1986; Ref. 172253 CA, Vol. 127; Ref. 42340 CA, Vol. 117; Biosis Abstract, Ref. 310470, 1996;
⑯ Erfinder:	
⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:	
US 48 94 443 EP 07 39 984 A1 EP 05 02 812 A1 EP 03 89 043 A1 WO 97 34 001 A1 WO 97 23 236 A1 WO 97 19 957 A1 WO 97 15 665 A1 WO 97 13 410 A1 WO 97 09 437 A1 WO 96 41 881 A1 WO 96 40 789 A1	

WO 96 38 571 A2
WO 96 29 417 A1
WO 95 22 618 A1

Chemical Abstracts:
Ref. 246798, Vol. 127, 1997;
Ref. 171221, Vol. 127, 1997;
Ref. 132533d, Vol. 127, 1997;
Ref. 14278d, Vol. 126, 1997;
Ref. 308657z, Vol. 124, 1996;
Ref. 278463t, Vol. 123, 1995;
Ref. 235631s, Vol. 120, 1994;
Ref. 235530h, Vol. 120, 1994;
Ref. 291810m, Vol. 120, 1994;
Ref. 189726, Vol. 120, 1994;
Ref. 162459, Vol. 118, 1993;
Ref. 51967h, Vol. 118, 1993;
Ref. 21259r, Vol. 117, 1992;
Ref. 273038h, Vol. 115, 1991;
Ref. 84908f, Vol. 115, 1991;
Ref. 110481s, Vol. 113, 1990;
Ref. 57347z, Vol. 113, 1990;
Ref. 109394x, Vol. 110, 1989;
Ref. 219576h, Vol. 106, 1987;
Ref. 103262g, Vol. 104, 1986;
Ref. 172253 CA, Vol. 127;
Ref. 42340 CA, Vol. 117;
Biosis Abstract, Ref. 310470, 1996;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Transportsystem zur Einbringung von Proteinen in Zielzellen mit Hilfe eines Fusionsproteins, Nucleinsäurekonstrukte kodierend für die Komponenten des Transportsystems und Arzneimittel, die Komponenten des Transportsystems umfassen

⑯ Offenbart wird ein Proteintransportsystem umfassend ein Fusionsprotein, das
a) eine Interaktions-Domäne, die spezifisch an eine Bindungs-Domäne binden kann, und
b) eine Polypeptidkette, die in eine Zielzelle transportiert werden soll,
aufweist und ein Polypeptid, das eine Bindungs-Domäne
(c) aufweist, die spezifisch an die Interaktions-Domäne binden kann.

DE 197 35 105 A 1

DE 197 35 105 A 1

Beschreibung

Bei den verschiedensten molekularbiologischen Anwendungsgebieten ist der Transport von Proteinen durch die Plasmamembran in Gewebe- oder Kulturzellen und beim lebenden Organismus mit ganz erheblichen Schwierigkeiten verbunden.

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Methoden bekannt, die für die Einschleusung von Proteinen in das Zellinnere verwendet werden, wie beispielsweise die Permeabilisierung von Zellen, die Mikroinjektion von Proteinen, die Transfektion von geeigneten Vektoren und sogenannte Immunotoxine. Verschiedene bakterielle Toxine, die intrazellulär wirken, sind in der Lage, mit Hilfe eines komplexen Transportsystems durch die Plasmamembran in die Zelle zu gelangen. Einige dieser Toxine werden dazu verwendet, um gezielt bestimmte Zellen abzutöten.

Die bisher entwickelten Immunotoxine gehen von sogenannten Einkettentoxinen aus, die aus einer Zellbindungsdomäne, einer Translokationsdomäne und einer zelltoxischen Domäne bestehen. Beispiele hierfür wären das Diphtherie-Toxin oder das Pseudomonas Exotoxin A. Es ist ein Prinzip der Immunotoxine, durch eine veränderte Zellbindungsdomäne eine selektive Bindung der Toxine an eine bestimmte Population von Zielzellen zu erreichen, um diese schließlich durch die Toxin-Domäne abzutöten.

Die bisher bekannten Lösungen des transmembranären Proteintransports weisen jedoch erhebliche Nachteile auf. So verletzen Permeabilisierung- und Mikroinjektionstechniken die Integrität der Zellen und außerdem sind diese Techniken in der Regel nur bei einzelnen Zellen bzw. Zellkulturen, nicht aber bei vollständigem Gewebe anwendbar.

Bei den Transfektionen werden geeignete Vektoren, die häufig aus viralen Bestandteilen aufgebaut sind, in die Zellen eingebracht und die in den Vektoren enthaltenen Gene sollen dann in den Zielzellen exprimiert werden. Problematisch ist hier häufig die fehlende Steuerbarkeit der Expression und die Tatsache, daß nur einige Zellen transfiziert werden sowie daß die Transfektion in der Regel nicht zellspezifisch ist.

Die Immunotoxine sind in der Regel verhältnismäßig große Proteine, die häufig nur unter Schwierigkeiten exprimiert werden können. Sie sind auch nicht geeignet für bestimmte Zelltypen. Darüber hinaus sind Immunotoxine generell toxisch und daher nur mit erheblichen Schwierigkeiten zu handhaben.

Es sind verschiedene bakterielle Exotoxine bekannt, die eukaryotische Zellen durch eine kovalente Modifikation von intrazellulären Zielmolekülen angreifen. Man geht davon aus, daß für die Wirkung dieser Toxine üblicherweise mehrere Schritte erforderlich sind:

Zuerst binden die Toxine über einen Bindungsbereich oder eine spezifische Bindungskomponente an einen Rezeptor an der Oberfläche der Zielzellen. Daran schließt sich eine durch den Rezeptor bewirkte Endozytose an. So gelangt das giftige Protein in das Cytosol, wo die Enzymkomponente ein spezifisches Zielmolekül verändert, wodurch funktionelle Veränderungen der Zielzelle bewirkt werden. Bei dem Diphtherie-Toxin, das als Prototyp bakterieller Proteintoxine angesehen werden kann, konnten drei funktionelle Domänen identifiziert werden, die verantwortlich sind für die Rezeptorbildung, die Membrantranslokation und die Enzymaktivität.

Bei den meisten Toxinen, wie bei dem Diphtherie-Toxin oder dem Pseudomonas Exotoxin A sind diese funktionellen Bereich auf einer einzigen Toxin-Kette lokalisiert, wobei unterschiedliche Ketten durch Disulfid-Brücken verbunden sein können, oder diese funktionellen Domänen können auch nicht kovalent assoziiert sein, wie z. B. beim Cholera-Toxin oder beim Keuchhusten-Toxin.

Demgegenüber werden erfahrungsgemäß nicht die Transportsysteme der oben erwähnten Einkettentoxine, sondern die der sogenannten binären Toxine eingesetzt. Bei diesen binären Toxinen sind die Zellbindungs-/Translokationskomponenten und das giftige Enzym getrennte Proteine, die sich auf der Oberfläche der Zielzelle treffen.

Die einzelnen Komponenten dieser binären Toxine werden bei dem erfahrungsgemäßen Proteintransportsystem eingesetzt. Das erfahrungsgemäße Proteintransportsystem weist mindestens ein Fusionsprotein und eine weitere Polypeptidkomponente auf, die zusammenwirken, aber bevorzugt getrennt voneinander vorliegen. Allerdings ist es auch möglich, daß diese Komponenten Fusionsprotein und Polypeptid in räumlicher Hinsicht zusammen vorliegen. Unter dem Begriff "Fusionsprotein" wird ein Polypeptid verstanden, das wenigstens zwei Komponenten aufweist, die von verschiedenen Proteinen stammen, wobei die einzelnen Polypeptidketten kovalent über Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Unter einem Polypeptid im Sinne der vorliegenden Erfindung wird eine Verbindung verstanden, die mindestens 50, bevorzugt mindestens 100 Aminosäuren aufweist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Fusionsprotein, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es

- a) eine Interaktions-Domäne, die spezifisch an eine Bindungs-Domäne binden kann, und
- b) eine Polypeptidkette, die in eine Zielzelle transportiert werden soll,

umfaßt.

Fusionsprotein im Sinne der vorliegenden Anmeldung ist ein Polypeptid, das wenigstens zwei Komponenten aufweist, die in der Natur nicht in Form von aneinander fusionierten Polypeptiden vorkommen. Der eine Teil des Fusionsproteins (a) beinhaltet eine Interaktions-Domäne, die als Adapter und Carrier für diejenigen Proteine dient, die in die Zielzellen transferiert werden sollen. Diese Interaktions-Domäne bindet spezifisch an eine Bindungs-Domäne, die wiederum an bestimmte Komponenten der Zielzelle bindet. Die Interaktions-Domäne bewirkt also, daß die damit verbundene Polypeptidkomponente (b) über die Bindungsdomäne an die Zielzelle gebunden wird.

Erfahrungsgemäß stammt die Interaktions-Domäne von einem binären bakteriellen Toxin, wie dem Anthrax-Toxin oder dem Clostridium perfringens iota Toxin. Das Clostridium perfringens iota Toxin ist ein Mitglied der Familie der binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine.

Besonders bevorzugt stammt die Interaktions-Domäne von dem C2-Toxin von Clostridium botulinum, und genauer handelt es sich bei der Interaktions-Domäne um die N-terminale C2I-Domäne des C2-Toxins von C.botulinum.

Das C2-Toxin von Clostridium botulinum besteht aus einer Bindungskomponente C2II, die eine Bindungs-Domäne umfaßt, die an die Zielzelle bindet und aus einer biologisch aktiven Toxin-Komponente C2I, die durch die Bindungskom-

ponente in die Zielzelle transportiert wird. Die Bindungskomponente C2II hat ein Molekulargewicht von etwa 100 kDa und bindet mit einem Rezeptor der Zielzelle, wodurch eine Bindungsstelle für die enzymatische Toxinkomponente C2I induziert wird. Nach Transport durch die Zytosoma-Membran und Überführung in das Cytosol ADP-ribolysiert C2I, genauer der C-terminale Teil von C2I, monomeres G-Aktin an Arginin 177 und inhibiert dadurch die Aktin-Polymerisation.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß das C2I-Toxin aus wenigstens zwei Domänen besteht. Die am C-Terminus lokalisierte Domäne C2I-C ist für die katalytische Aktivität, nämlich die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität verantwortlich. Die am N-Terminus lokalisierte andere Domäne (C2I-N) ist für die Erkennung und Interaktion mit der Bindungskomponente (C2II), die an die Zielzellen bindet, essentiell. Erfindungsgemäß wird nur die Interaktions-Domäne (C2I-N) in den erfindungsgemäßen Fusionsproteinen verwendet, und zwar als "Adapter" oder "Carrier" für solche Proteine, die in die Zielzellen transferiert werden sollen. Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein weist beispielsweise nicht die toxische Enzymkomponente (C2I-C) des C2-Toxins zusammen mit C2I-N auf. Erfindungsgemäß assoziiert das Fusionsprotein über den Adapterteil C2I-N mit der Bindungskomponente C2II, die ihrerseits mit einem spezifischen Zellrezeptor an der Oberfläche der Zielzelle assoziiert ist. Das Vorhandensein der Interaktions-Domäne in dem Fusionsprotein ermöglicht die Translokation des Fusionsproteins in die Zielzelle hinein.

In bevorzugter Weise stammt dagegen die Bindungs-Domäne, die spezifisch an die Interaktions-Domäne binden kann, von demselben bakteriellen Toxin her, von dem auch die Interaktions-Domäne stammt, da hierdurch eine optimale Interaktion erzielt werden kann. Da die Bindung zwischen der Interaktions-Domäne und der Bindungs-Domäne in der Regel höchst spezifisch ist, stammen bevorzugt die jeweiligen Domänen von demselben Organismus und in der Regel auch von demselben Toxin her.

Grundsätzlich können im Rahmen der vorliegenden Erfindung beliebige Polypeptidkomponenten mit Hilfe des erfindungsgemäßen Proteintransportsystems in die Zielzellen eingebracht werden. In bevorzugter Ausführungsform handelt es sich jedoch bei der Polypeptidkomponente um ein Toxin, das bevorzugt von Bakterien oder Pflanzen stammen kann und ein Polypeptid-Toxin ist. Beispiele für geeignete Polypeptidkomponenten (b) wären das Diphtherie-Toxin oder das Pseudomonas Exotoxin A, wobei es sich hierbei nur um die Toxinkomponente handelt, ohne diejenigen Komponenten, die für den Transport durch die Plasma-Membran verantwortlich sind. Es können aber auch pflanzliche Toxine, wie beispielsweise das Ricin verwendet werden. Bevorzugt werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Neurotoxine verwendet, die von Clostridium tetani oder Clostridium botulinum herstammen und Zytotoxine von C. difficile (z. B. Toxin A und B), C. sordellii (lethales Toxin und hämorrhagisches Toxin) und C. novyi (α -Toxin). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Toxin um das C3-ähnliche Exoenzym von Clostridium limosum. Dieses Exoenzym hat ein Molekulargewicht von etwa 23 kD und inaktiviert das kleine GTP-bindende Protein Rho durch ADP-Ribosylierung von Asparaginsäure in Position 41.

Das erfindungsgemäße Proteintransportsystem weist als weitere Komponente eine von dem Fusionsprotein getrennte Bindungs-Domäne (c) auf, die an die Interaktions-Domäne (a) der Fusionsproteine binden kann.

Diese Bindungs-Domäne (c) kann entweder getrennt von oder zusammen mit dem Fusionsprotein mit den Zielzellen in Kontakt gebracht werden. Das die Bindungs-Domäne enthaltende Polypeptid bindet an die Zielzellen über eine für die jeweiligen Zielzellen spezifische Ligandendomäne. Bei dem Liganden kann es sich um ein Molekül handeln, das spezifisch an bestimmte Rezeptoren der Zielzellen bindet. In bevorzugter Ausführungsform weist das Polypeptid eine Bindungs-Domäne auf, die mit einer Bindungsregion aus dem variablen Bereich eines monoklonalen Antikörpers verbunden ist.

Das erfindungsgemäße Proteintransportsystem umfaßt daher auch ein Polypeptid, das eine Bindungs-Domäne (c) aufweist, die spezifisch an die Interaktions-Domäne (a) eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins binden kann.

Damit dieses Polypeptid an eine Zielzelle binden kann, weist es weiterhin eine Ligandendomäne für die Zellbindung auf. Dieser Ligand für die Zellbindung bindet spezifisch an einen bestimmten Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle.

Bevorzugt stellt der Ligand, der spezifisch an einen Zellrezeptor bindet, die variable Region eines monoklonalen Antikörpers dar. Derartige Bereiche können nach an sich bekannten Methoden kloniert und in geeigneter Art und Weise mit der Bindungs-Domäne (c) verbunden werden.

Die einzelnen Komponenten des erfindungsgemäßen Proteintransportsystems werden in bevorzugter Art und Weise mit gentechnologischen Mitteln hergestellt. Hierzu wird die für die einzelnen Komponenten kodierende Nucleinsäure in ein Nucleinsäurekonstrukt eingebracht, das dann in einer geeigneten Wirtszelle vermehrt wird, wobei eine Expression der gewünschten Gene erzielt wird. Die so exprimierten Fusionsproteine werden entweder von den Wirtszellen ins Medium ausgeschieden oder aus den Wirtszellen isoliert. Bei den Nucleinsäurekonstrukten handelt es sich in bevorzugter Weise um Vektoren, wobei Plasmidvektoren, die zur Expression in Bakterien oder Hefen geeignet sind, besonders bevorzugt sind.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukte weisen mindestens die genetische Information für ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein und/oder für ein erfindungsgemäßes Polypeptid auf sowie diejenigen Nucleinsäurefragmente, die zur Vermehrung des Konstruktes in der Wirtszelle und zur Expression des Fusionsproteins und/oder Polypeptids in der Wirtszelle erforderlich sind.

Bevorzugt handelt es sich bei einem derartigen Nucleinsäurekonstrukt um einen Vektor, wobei dieser Vektor bevorzugt ein viraler Vektor oder ein Plasmid sein kann.

Die erfindungsgemäßen Komponenten werden bevorzugt als Arzneimittel eingesetzt. Ein derartiges Arzneimittel kann beispielsweise eine Polypeptidkomponente, die eine Bindungs-Domäne (c) umfaßt, aufweisen, wobei diese Polypeptidkomponente spezifisch an gewünschte Zielzellen binden kann. Bei den Zielzellen kann es sich beispielsweise um Tumorzellen handeln, die bestimmte Tumorantigene auf der Zelloberfläche exprimieren. Wenn nun der Liganden-Anteil des Polypeptids mit dem Tumorantigen bindet, weisen die Zielzellen auf der Oberfläche die spezifische Bindungs-Domäne auf.

Wenn nun das Fusionsprotein mit diesen Zellen in Kontakt gebracht wird, bindet das Fusionsprotein über die Interaktions-Domäne (a) und die Bindungs-Domäne (c) an die Zielzelle. Dann wird das mit dem Fusionsprotein verbundene Po-

lypeptid (b), das bevorzugterweise ein Toxin ist, in das Innere der Zelle transportiert und kann dort seine Aktivität entfalten.

Der besondere Vorteil der erfindungsgemäßen Lösung besteht darin, daß die einzelnen Komponenten nicht toxisch sind und, daß dadurch keine Handhabungsprobleme entstehen. Erst wenn Bindungs-Domäne und Interaktions-Domäne zusammenkommen, wird das Toxin in die Zelle eingeführt und entfaltet dort die beabsichtigte Aktivität. Dadurch ist es beispielsweise möglich, ganz gezielt bestimmte Zellen abzutöten, ohne die anderen Zellen durch die toxischen Komponenten zu belasten.

Ein erfindungsgemäßes Arzneimittel kann in voneinander getrennten Einheiten ein Fusionsprotein und ein Polypeptid umfassen. Dadurch können die beiden Komponenten nacheinander oder auch zusammen verabreicht werden. Bevorzugt handelt es sich hierbei um ein für die parenterale Verabreichung geeignetes Arzneimittel.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgend wiedergegebenen Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

15 Konstruktion von C2IN und C2IN-C3

Das C2I-Gen (1293 Bp) wurde von einem C.botulinum-Stamm mit der Bezeichnung KZZ 1577 mit Hilfe der Polymerasenkettreaktion amplifiziert. Dazu wurden 300 ng chromosomal DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit zwei Einheiten Tag DNA Polymerase in einer üblichen Reaktionsmischung mit den einzelnen Nucleotiden und 15 pmol der Primer C2IC (5'-AGATCTATGCCAATAAAAGAACCC-3', Seq.-ID-Nr. 1) enthaltend eine BgIII-Schnittstelle und C2IN (5'-GGATCCCTAAATCTCTTATTGTATAAC-3', Seq.-ID Nr. 2) enthaltend eine BamHI-Schnittstelle. Die Amplifikation wurde bei üblichen Bedingungen durchgeführt und das dabei erhaltene PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 kloniert.

Für die Expressionsexperimente wurde das C2I-Gen mit BgIII/BsaBI geschnitten und in den mit BamHI/SmaI verdauten Vektor pGEX2T kloniert, wodurch das Plasmid pGEX2T-C2I entstand. Das pGEX2T-C2IN-Konstrukt wurde erhalten durch BamHI-Verdau von pGEX2T-C2I gefolgt von einer Religation des etwa 6000 Basenpaaren langen pGEX2T-C2IN-Fragments und dieser Vektor wurde in kompetente E.coli-Zellen transformiert. Für die Konstruktion von pGEX-C2IN-C3 wurde das C.limosum C3-Gen von einem C3 enthaltenden pCR2.1-Vektor ausgeschnitten durch Verdau mit BgIII und BamH1, ligiert mit BamH1-verdaute pGEX-C2IN und transformiert in kompetente E.coli-Zellen. C2IN und C2IN-C3 wurden sequenziert unter Verwendung der Sequenzierprimer 5'pGEX2T-58 und 3'pGEX2T-43. Zum Sequenzieren der Grenzen von C2IN-C3 wurde der Primer C2IN-C3' (5'GCTATTATAACTATAAAGGG-3', Seq.-ID Nr. 3) verwendet. Die Sequenzierreaktion wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Beispiel 2

35 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine

Rekombinante GST-Fusionsproteine wurden in E.coli transformiert mit dem entsprechenden DNA-Fragment in dem pGEX2T-Vektor und nach der Anweisung des Herstellers gereinigt. Die erhaltenen Fusionsproteine mit GST wurden nach Verdau mit Thrombin zentrifugiert und der Überstand wurde mit SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit Antiserum gegen C2I oder C3 untersucht.

Beispiel 3

45 Klonierung, Expression und Charakterisierung des N-terminalen Teils von C2I (C2IN)

Um den N-terminalen Teil von C2I (C2IN, Aminosäuren 1-225) auf ADP-Ribosyltransferaseaktivität zu analysieren und auf dessen Fähigkeit, an C2II zu binden, wurde C2IN als GST-C2IN-Fusionsprotein in E.coli exprimiert. pGEX2T-C2IN wurde durch BamHI-Verdau von pGEX2G-C2I und anschließende Religation des pGEX2T-C2IN-DNA-Fragments und Transformation dieses Vektors in kompetente E.coli-Zellen durchgeführt. Schematisch sind die hier interessierenden Bereiche in Fig. 1 dargestellt. Die Identität von C2IN wurde durch Sequenzanalyse bestätigt. Das C2IN-Protein wurde gereinigt und anschließend analysiert mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten Gels (Fig. 2 A) und einer Western Blot-Analyse mit Antiserum gegen C2I. Dies ist in Fig. 2 B dargestellt. Das C2IN-Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 25 kDa und wird durch spezifisches Anti-C2I-Antiserum erkannt. Um nachzuweisen, ob C2IN eine ADP-Ribosyltransferaseaktivität aufweist, wurde der ADP-Ribosylierungstest für G-Actin mit Rattenhirnlysat durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, daß in Gegenwart von C2IN keine ADP-Ribosylierung von Act in beobachtet werden konnte. Daraus konnte geschlossen werden, daß sich das aktive Zentrum der Transferase nicht auf dem N-terminalen Teil von C2I befindet. Außerdem rief das Polypeptid C2IN keinen cytotoxischen Effekt in Gegenwart von C2II bei HeLa-Zellen hervor.

60 Beispiel 4

Der N-terminale Teil von C2I ist verantwortlich für die Bindung an C2II

Um zu testen, ob das Polypeptid C2IN die Interaktion von ganzem C2I und C2II beeinflußt, wurden CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells) mit Trypsin-aktiviertem C2II (200 ng/ml) und C2I (100 ng/ml) in Gegenwart von wachsenden Konzentrationen von C2IN (100, 300, 600, 1000 ng/ml) bei 37°C inkubiert. Nach drei Stunden wurden die Zellen auf einem Objektträger fixiert und die Anzahl der abgerundeten Zellen pro Feld wurde bestimmt. Fig. 3 zeigt, daß C2IN effektiv das durch C2I induzierte Abrunden der Zellen hemmt, woraus geschlossen werden konnte, daß der N-terminale

Teil von C2I die Toxin-Interaktionsstelle aufweist.

Beispiel 5

Klonierung und Expression des C2IN-C3-Fusionstoxins

5

Es wurde ein Fusionstoxin C2IN-C3 unter Verwendung des N-terminalen Fragmentes C2IN und des C3-Gens von Clostridium limosum hergestellt. Dazu wurde das C3-Gen von C.limosum aus dem pCR2.1-Vektor durch Verdau mit BglII/BamH1 ausgeschnitten und anschließend wurde das C3 DNA-Fragment aus dem Agarose-Gel isoliert und in den mit BamH1 verdauten pGEX2T-C2IN-Vektor ligiert. Die Konstruktion ist schematisch in Fig. 4 dargestellt. Nach Transformation dieses Plasmids in kompetente E.coli-Zellen wurden Kolonien dahingehend durchsucht, ob sie den pGEX2T-C2IN-C3-Vektor enthielten, und zwar durch Western Blot-Analyse mit Anti-C2I-Antiserum. Das so erzeugte C2IN-C3-Fusionsgen wurde aus einem positiven Klon isoliert und nach Standardmethoden sequenziert. Das durch diesen Klon exprimierte Fusionsprotein wurde biochemisch identifiziert und charakterisiert. Die dabei ermittelte DNA-Sequenz bestätigte das Vorhandensein des Fusionsproteins.

10

Das C2IN-C3-Fusionsprotein wurde in E.coli exprimiert und einerseits mit Anti-C2I-Antikörpern und andererseits mit Anti-C3-Antikörpern als ein Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa identifiziert (C2IN ~ 25 kDa plus C3 ~ 23 kDa).

15

Fig. 5 zeigt, daß das Fusionsprotein tatsächlich die beiden Komponenten beinhaltet. In dem linken Teil der Abbildung, der überschrieben ist mit Anti-C2I wurde Antiserum gegen C2I aufgetragen. Es wurde keine Reaktivität mit der in Spur 4 aufgetragenen C.limosum-Transferase gefunden, jedoch konnte eine Reaktivität nachgewiesen werden mit C2I (Spur 1), C2IN (Spur 2) und dem C2IN-C3-Fusionsprotein (Spur 3). In der rechten Hälfte der Fig. 5 wurden dieselben Fragmente wie bei der linken Hälfte aufgetragen, jedoch mit einem Anti-C3-Antikörper umgesetzt. Hier konnte eine immunologische Reaktion mit dem C2IN-C3-Fusionsprotein (Spur 3) und der C.limosum-Transferase (Spur 4) aufgefunden werden. Der Anti-C3-Antikörper reagierte jedoch nicht mit C2I (Spur 1) oder C2IN (Spur 2).

20

25

Beispiel 6

ADP-Ribosylierung von Rho durch das C2IN-C3-Fusionstoxin

30

Um die katalytische Aktivität und Substratspezifität des C2IN-C3-Fusionstoxins in vitro zu untersuchen, wurde ein ADP-Ribosylierungstest mit Rattenhirnlysat durchgeführt. Dabei wurden die Genprodukte C2I, C2IN, C2IN-C3 und C3 im Hinblick auf ihre Substratspezifitäten verglichen.

Fig. 6 zeigt die erwarteten Ergebnisse. Durch C2I (Spur 1) wird Actin ADP-ribosyliert. Mit C2IN (Spur 2) wird keine Aktivität erhalten.

35

Durch das C3-Toxin (Spur 4) wird Rho ADP-ribosyliert und das C2IN-C3-Fusionstoxin ADP-ribosyierte ausschließlich Rho, aber nicht Actin, was dafür spricht, daß das Fusionsprotein die für C3 typische Substratspezifität aufweist (Spur 3).

40

Beispiel 7

Cytotoxische Effekte von C2IN-C3 bei Zellkulturen

Es wurde untersucht, ob C2II dazu in der Lage war, den Transfer des Fusionsproteins C2IN-C3 in eukaryotische Zellen zu bewirken. Für den Cytotoxizitätstest wurden subkonfluente, einschichtige CHO-Zellen mit 200 ng/ml aktiviertem C2II mit 100 ng/ml C2I oder 200 ng/ml Fusionsprotein C2IN-C3 inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurde durch C2I/C2II und C2IN-C3/C2II eine Abrundung der Zellen induziert und eine Neuverteilung des Actincytoskeletts festgestellt. Daraus kann geschlossen werden, daß die Zerstörung des Actincytoskeletts durch die ADP-Ribosylierung von G-Actin im Fall von C2I und durch ADP-Ribosylierung von Rho im Fall von C2IN-C3 bewirkt wurde.

45

Die Anfärbung von F-Actin mit Phalloidin-Rhodamin zeigte den Unterschied zwischen der Zerstörung des Oytoskeletts durch C2 oder durch das C2IN-C3-Toxin. Als Konsequenz der totalen Demontage der Actin-Filamente wurde nur noch eine sehr schwache Rhodamin-Fluoreszenz nach Behandlung der Zellen mit dem kompletten C2-Toxin gefunden. Demgegenüber ergab die Inkubation der Zellen mit C2II und dem Fusionstoxin C2IN-C3 eine amorphe Färbung des verbliebenen F-Actins, die charakteristisch ist für das C3-Toxin. Dieselben cytotoxischen Effekte der verschiedenen Toxin-Kombinationen wurden in HeLa-Zellen beobachtet. Um mögliche cytotoxische Aktivitäten der einzelnen Toxinproteine zu testen, wurden die Zellen entweder mit 200 ng/ml C2II, mit 200 ng/ml C2IN-C3 oder mit 1 µg/ml Olimosum C3 Exoenzym inkubiert. Die Inkubation der Zellen mit den einzelnen Toxin-Komponenten für drei Stunden verursachte keine Veränderungen in der Zellmorphologie oder in der F-Actin-Anordnung der Zellen.

50

Um die Spezifität der C2II-bewirkten Aufnahme des Fusionstoxins zu testen, wurden CHO-C2RK14-Zellen verwendet, die höchstwahrscheinlich keinen funktionellen C2II-Rezeptor aufweisen. Es wurde kein Effekt bei der C2II/C2IN-C3-Behandlung beobachtet, wenn diese Zellen für drei Stunden mit dem Toxin inkubiert wurden. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, daß der Transport des C2IN-C3-Fusionstoxins in die Zelle durch einem C2II-Rezeptor-vermittelten Weg erfolgt.

55

Um die Zeitabhängigkeit der durch das Fusionstoxin induzierten Effekte zu analysieren, wurden die Polypeptide zu Zellen gegeben, die auf Objektträgern gewachsen waren und alle 30 Minuten wurde eine Probe mit PFA fixiert. Wie in Fig. 7 A gezeigt, wurden keine morphologischen Veränderungen beobachtet, wenn die Zellen mit bis zu 30 µg/ml C.limosum C3-Toxin behandelt wurden. In Gegenwart des erfundungsgemäßen Proteintransportsystems [C2IN-C3/C2II (jeweils 200 ng/ml)] begannen die CHO-Zellen sich nach 60 Minuten abzurunden und 120 Minuten nach der Zugabe des

60

65

Toxins waren mehr als 50% der Zellen rund. Die HeLa-Zellen waren weniger sensitiv, jedoch rundeten sich mehr als 80% der Zellen nach dreistündiger Inkubation ab. Diese Ergebnisse sind in Fig. 7 A dargestellt. Als Kontrolle (dargestellt durch ein Dreieck) wurden CHO- und HeLa-Zellen jeweils nur mit dem C3-Toxin inkubiert.

Um die C2IN-C3-katalysierte ADP-Ribosylierung von Rho in intakten Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen lysiert und Rho wurde ADP-ribosyliert in Lysaten von behandelten Zellen in Anwesenheit von radiomarkiertem NAD und C3-Toxin. Wie in Fig. 7 B und C gezeigt, wurde ein zeitabhängiger Abfall von radiomarkiertem Rho-Protein beobachtet. Nach 2,5 Stunden Inkubation mit C2IN-C3/C2II waren etwa 80% des zellulären Rho ADP-ribosyliert und nach drei Stunden (Fig. 7 C) wurde keine Radiomarkierung in den Zellysaten mehr aufgefunden, was für die Modifikation von Rho durch C2IN-C3 in intakten Zellen spricht.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 197 35 105 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

ANMELDER:

- (A) NAME: Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- (B) STRASSE: Werthmannplatz
- (C) ORT: Freiburg
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 79098

5

10

ANMELDETITEL:

Transportsystem zur Einbringung von
Proteinen in Fusionszellen mit Hilfe
eines Fusionsproteins, Nukleinsäure-
konstrukte kodierend für die ...

15

ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy Disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PADAT Sequenzmodul Version 1.0

20

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

25

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

27

AGATCTATGC CAATAATAAA AGAACCC

40

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

45

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

30

GGATCCCTAA ATCTCTTAT TTTGTATAAC

55

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

60

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

60

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

23

GCTATTATAAA CTACTATAAA GGG

Patentansprüche

1. Fusionsprotein, dadurch gekennzeichnet, daß es
 - a) eine Interaktions-Domäne, die spezifisch an eine Bindungs-Domäne binden kann, und
 - b) eine Polypeptidkette, die in eine Zielzelle transportiert werden soll,
umfaßt.
2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Interaktions-Domäne von einem binären bakteriellen Toxin stammt.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Interaktions-Domäne von dem Anthrax-Toxin stammt.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Interaktions-Domäne von dem Clostridium perfringens iota Toxin stammt.
5. Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Interaktions-Domäne von dem C2-Toxin von Clostridium botulinum stammt.
6. Fusionsprotein nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Interaktions-Domäne die N-terminale C2I-Domäne des C2-Toxins von C.botulinum umfaßt.
7. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 2–6, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungs-Domäne, die spezifisch an die Interaktions-Domäne binden kann, von demselben bakteriellen Toxin stammt, von dem auch die Interaktions-Domäne stammt.
8. Fusionsprotein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Polypeptidkomponente (b) ein Toxin ist.
9. Fusionsprotein nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Toxin ein pflanzliches Toxin ist.
10. Fusionsprotein nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Toxin ein bakterielles Toxin ist.
11. Fusionsprotein nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das bakterielle Toxin ein Neurotoxin ist, das von Clostridium tetani oder Clostridium botulinum stammt.
12. Fusionsprotein nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das bakterielle Toxin ein Zytotoxin von Clostridium difficile, C.sordellii oder C.novyi ist.
13. Fusionsprotein nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das bakterielle Toxin das Exoenzym C3 von C.botulinum oder ein C3-ähnliches Toxin ist.
14. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es eine (c) Bindungs-Domäne aufweist, die spezifisch an die Interaktions-Domäne (a) eines Fusionsproteins nach einem der Ansprüche 1–13 binden kann.
15. Polypeptid nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin einen Liganden für die Bindung an eine Zielzelle aufweist.
16. Polypeptid nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand für die Bindung an eine Zielzelle spezifisch an einen bestimmten Rezeptor auf der Zielzelle bindet.
17. Polypeptid nach einem der Ansprüche 14–16, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand, der spezifisch an einen Zellrezeptor bindet, die variable Region eines monokonalen Antikörpers ist.
18. Proteintransportsystem, dadurch gekennzeichnet, daß es wenigstens ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1–13 und wenigstens ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 14–17 aufweist.
19. Nucleinsäurekonstrukt, dadurch gekennzeichnet, daß es die genetische Information für ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1–13 und/oder für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 14–17 aufweist.
20. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Vektor handelt.
21. Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Plasmid ist.
22. Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, daß es in voneinander getrennten Einheiten ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1–13 und ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 14–17 umfaßt.
23. Arzneimittel nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein für die parenterale Verabreichung geeignetes Arzneimittel handelt.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

50

55

60

65

- Leerseite -

Fig. 2

A

M_r

50,600 -

35,500 -

1 2

B

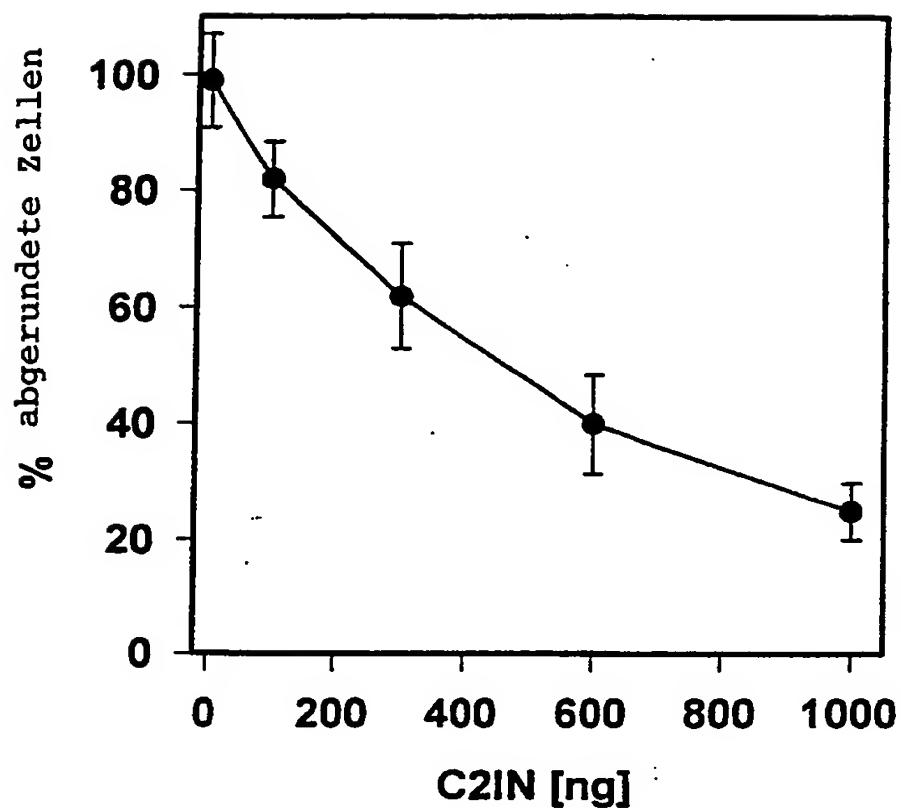
M_r anti-C2I

50,600 -

35,500 -

1 2

Fig. 3

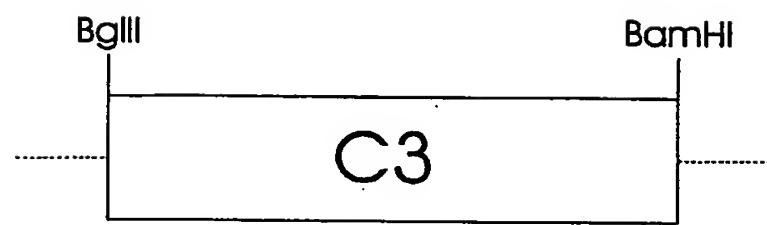


ZEICHNUNGEN SEITE 4

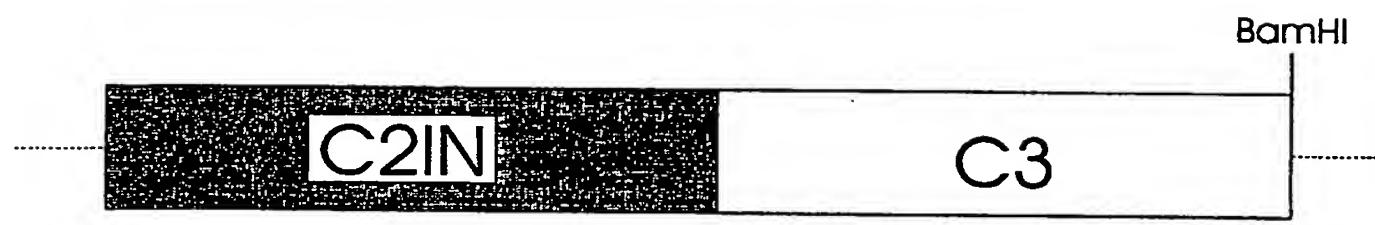
Nummer:
Int. Cl. 6:
Offenlegungstag:

DE 197 35 105 A1
C 07 K 14/33
4. März 1999

Fig. 4

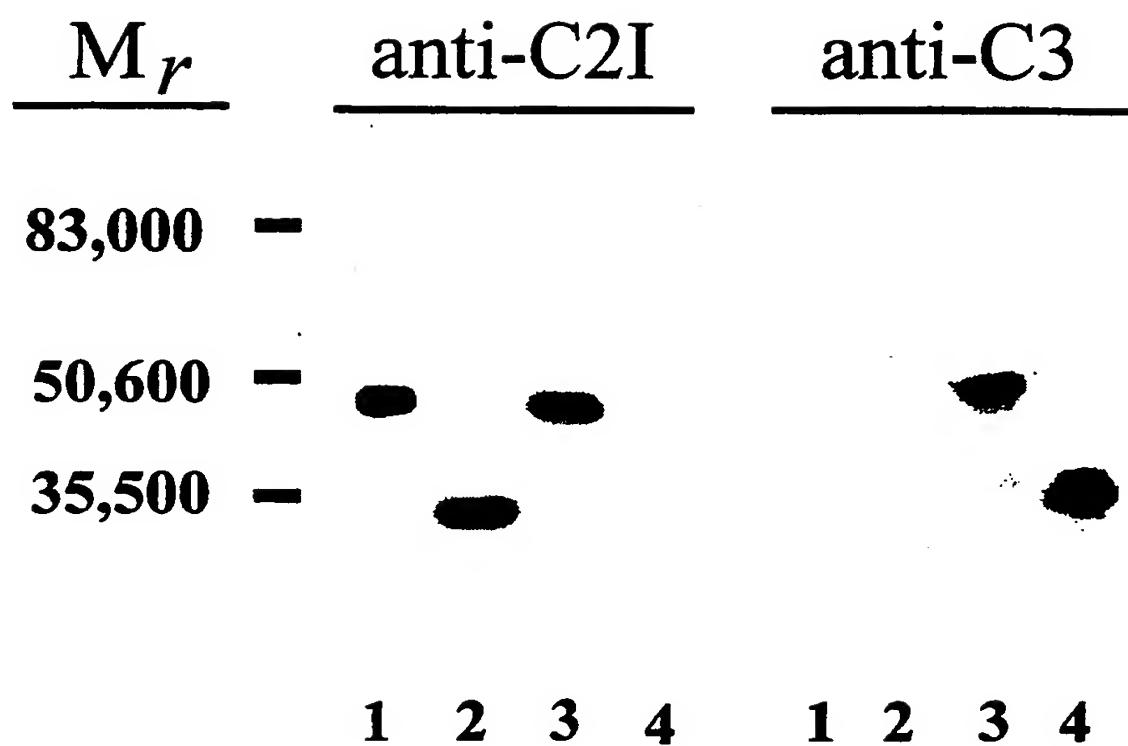


C3 in pCR2.1



C2IN-C3 in pGEX2T

Fig. 5



ZEICHNUNGEN SEITE 6

Nummer:
Int. Cl. 6:
Offenlegungstag:

DE 197 35 105 A1
C 07 K 14/33
4. März 1999

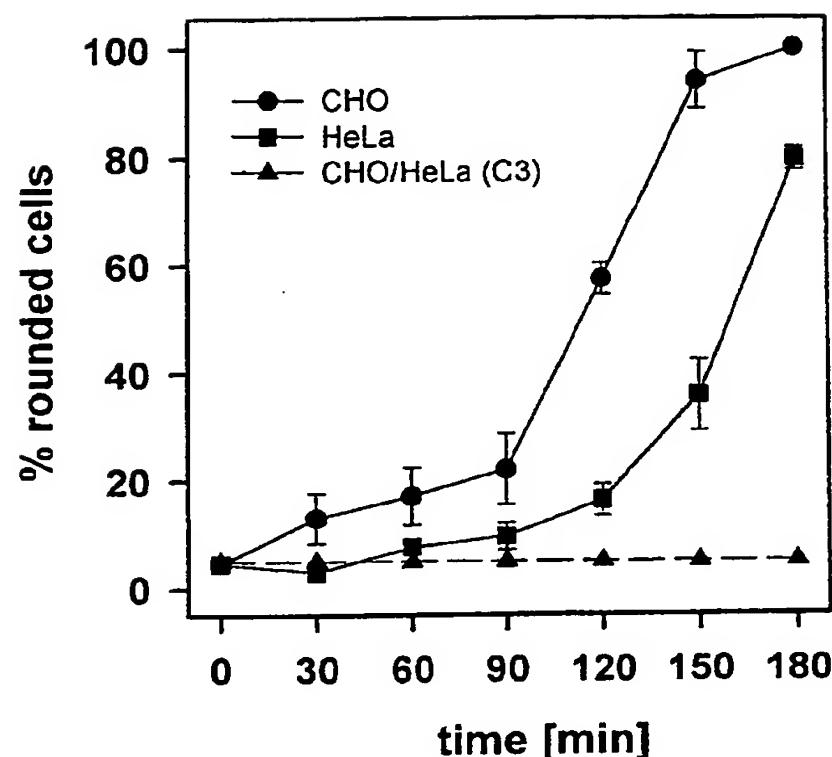
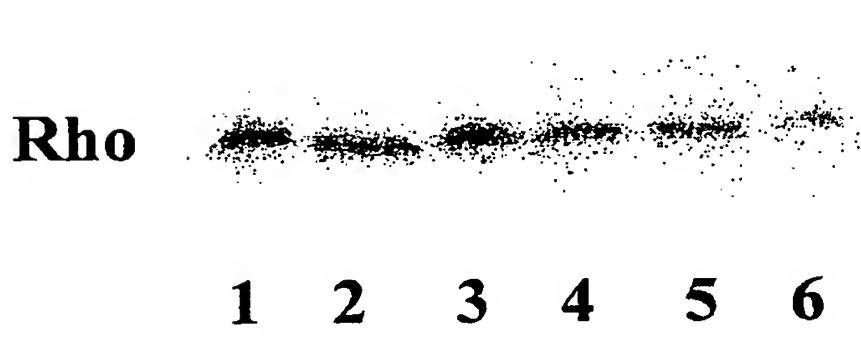
Fig. 6



Actin

Rho

Fig. 7

A**B****C****Rho**

1 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)